



Universidade de Brasília

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CEILÂNDIA

CURSO DE FARMÁCIA

NATÁLIA THAIS CORREA MURICI

**ESTUDO DA HIDRÓLISE DO AMIDO DE MILHO VERDE E DE BATATA
DOCE COM USO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE
BEBIDA ALCOÓLICA DESTILADA**

BRASÍLIA, DF

2015

NATÁLIA THAIS CORREA MURICI

**ESTUDO DA HIDRÓLISE DO AMIDO DE MILHO VERDE E DE BATATA
DOCE COM USO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE
BEBIDA ALCOÓLICA DESTILADA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento

BRASÍLIA, DF
2015

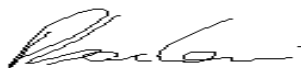
NATÁLIA THAIS CORREA MURICI

**ESTUDO DA HIDRÓLISE DO AMIDO DE MILHO VERDE E DE BATATA
DOCE COM USO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS PARA PRODUÇÃO DE
BEBIDA ALCOÓLICA DESTILADA**

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)



Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento
(FCE/ Universidade de Brasília)



Farmacêutico: Igor Albuquerque de Sousa
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2015

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo testar a hidrólise dos amidos de milho verde e da batata doce, com uso de enzimas amilolíticas fúngicas, para a produção de aguardente. Para o processo de hidrólise dos amidos de batata doce e de milho verde em açúcares, a suspensão de fungos *Aspergillus oryzae* e 0,8 mL de amiloglicosidase comercial foram misturadas com a solução gelificada de batata doce ou milho verde. Após incubação a 45°C por 12 horas os mostos hidrolisados obtidos, apresentaram teor de sólidos solúveis de 13,01°Brix para a batata doce e 11,10°Brix para o milho verde. Para a fermentação alcoólica usou-se fermento comercial da marca FERMENTIS®, contendo leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Os destilados foram obtidos por bidestilação, com separação das frações cabeça, coração e cauda. A aguardente de batata doce apresentou um rendimento de 13,3 litros a 40°GL para 100 Kg de batata doce e a aguardente de milho verde um rendimento de 8,4 litros a 51°GL para 100 Kg de milho verde. As frações coração dos destilados foram analisadas por cromatografia gasosa quanto aos teores de acidez volátil, aldeídos, ésteres, metanol, álcoois superiores, furfural e cobre. A aguardente de batata doce apresentou elevado teor de metanol, não se enquadrando nos parâmetros exigidos pela legislação brasileira. A aguardente de milho verde apresentou alto teor de álcoois superiores. Assim, verificou-se que os processos de produção das aguardentes foram viáveis em escala laboratorial, mas necessitam de adequação das metodologias para reduzir os teores de metanol e de álcoois superiores.

Palavras chave: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, enzimas amilolíticas, aguardente de milho verde, aguardente de batata doce.

ABSTRACT

This study aimed to test the hydrolysis of green corn and sweet potato starches, with use of fungal amylolytic enzymes, for the production of spirits. For the process of hydrolysis of sweet potato and green corn starches in sugars, suspension of the fungi *Aspergillus oryzae* and 0.8 mL of amyloglucosidase commercial were mixed with the solution gelated of sweet potato or green corn. After incubation at 45°C for 12 hours the hydrolysates obtained presented soluble solids content of 13.01°Brix for sweet potato and 11,10°Brix for green corn. For the alcoholic fermentation used yescst commercial FERMENTIS®, containing yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The distillates were obtained by bidistillation, with separation of fractions head, heart and tail. The spirit of sweet potato presented a yield of 13.3 liters at 40°GL for 100 kg of sweet potato and the spirit of presented green corn a yield of 8.4 liters at 51°GL for 100 kg of corn green. The fe crt of distillates were analyzed by gas chromatography with regard to levels of volatile acidity, aldehydes, esters, methanol, higher alcohols, furfuraldehyde and copper. The spirit of sweet potato presented high content of methanol and does not conform to the parameters required by Brazilian legislation. The spirit of green corn presented high content of higher alcohols. Thus, it was found that the processes of production of spirits were viable in laboratory scale, but need to adequacy of methodologies to reduce the levels of methanol and higher alcohols.

Key words: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, amylolytic enzymes, corn spirit , sweet potato spirit

SUMÁRIO

1. Introdução com revisão de literatura	10
1.1. O milho verde (<i>Zea mays</i>)	10
1.2. A batata doce (<i>Ipomoea batatas</i>)	10
1.3. O amido e as enzimas amilolíticas (amilases)	11
1.4. Microrganismos produtores de amilases: <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i>	15
1.5. Bebidas alcoólicas oriundas de matérias-primas amiláceas	16
1.6. Produção de bebidas destiladas	17
1.7. Análises físico-químicas do destilado	18
2. Objetivo geral	22
2.1. Objetivos específicos	22
3. Justificativa	23
4. Materiais e métodos	24
4.1. Microrganismos e manutenção das cepas	24
4.2. Obtenção dos fungos e amilases usados na hidrólise enzimática	24
4.3. Preparo das matérias-primas	25
4.4. Processo de hidrólise (liquefação e sacarificação) dos amidos de batata doce e milho verde	26
4.5. Fermentação alcoólica	26
4.6. Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de milho e de batata doce	27
4.7. Destilação do fermentado alcoólico de milho e de batata doce	27
4.8. Análises do destilado de milho e de batata doce	28
5. Resultados e discussão	29

5.1. Testes de hidrólises do amido de milho verde e batata doce com os fungos <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Aspergillus niger</i> e amiloglicosidase comercial	29
5.2. Produção de aguardente de batata doce	31
5.3. Produção de aguardente de. milho verde	34
5.4. Análises por cromatografia gasosa da fração coração das aguardentes de batata doce e milho verde	36
6. Conclusão	41
7. Referências bibliográficas	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparativo da produção de milho no Brasil.....	10
Tabela 2 – Componentes químicos e seus valores mínimos e máximos estabelecidos pela legislação brasileira para fins de qualidade da aguardente de cana- de açúcar	19
Tabela 3 - Teores de sólidos solúveis (grau Brix) inicial e final das soluções de milho verde e de batata doce durante o processo de hidrólise com o uso dos fungos <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> e amiloglicosidase comercial (AMG)	29
Tabela 4 - Análises dos mostos hidrolisados com uso dos fungos <i>Aspergillus oryzae</i> ou <i>Aspergillus niger</i> e amiloglicosidase comercial (AMG).....	30
Tabela 5 - Análises físico-químicas da batata doce e do mosto de batata doce.....	31
Tabela 6 - Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de batata doce....	32
Tabela 7 - Análises físico-químicas do destilado de batata doce (fração coração).....	33
Tabela 8 - Análises físico-químicas do milho verde e do mosto de milho verde.	35
Tabela 9 - Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de milho verde.....	35
Tabela 10 - Análises físico-químicas do destilado de milho verde (fração coração).....	36
Tabela 11 - Análises cromatográficas das frações coração das aguardentes de batata doce e milho verde.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do amido. (A) Amilose, cadeia não ramificada de resíduos de D-glicose interligadas por ligações do tipo α (1-4). (B) Amilopectina, polímero ramificado de unidades D-glicose na cadeia principal as ligações glicosídicas são do tipo α (1-4), nos pontos de ramificação ocorrem as ligações do tipo α (1-6).....	13
Figura 2 - Foto da fermentação no estado sólido utilizando farinha grossa de arroz para obtenção dos fungos e das amilases a) <i>Aspergillus niger</i> e b) <i>Aspergillus oryzae</i>	25
Figura 3 – Foto do destilador de laboratório	28
Figura 4 – Foto dos tubos falcon contendo a aguardente de milho verde e de batata doce.....	28
Figura 5 – Foto da fermentação no estado sólido utilizando farinha grossa de arroz com os fungos <i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i>	34

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Laudo das aguardentes de batata doce e milho verde.....	51
--	----

1. Introdução com revisão de literatura

1.1. O milho verde (*Zea mays*)

Uma das mais importantes culturas no mundo é a do milho (*Zea mays*), tendo grande importância econômica e social, devido ao seu valor nutricional na alimentação humana e animal e na indústria como matéria-prima. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, perdendo apenas para Estados Unidos e China. De acordo com a CONAB (2015), a produção apresentou um acréscimo de 5,8% em relação à produção passada 2014/2015 que foi de 80.051,7 mil toneladas e nesse ano de 2015 aponta para 84.729,2 mil toneladas. A região Centro-Oeste, maior produtora, se destacou com uma produção de 39.941,4 mil toneladas (Tabela1).

Tabela 1 – Comparativo da produção de milho no Brasil

REGIÃO	PRODUÇÃO (mil t)	
	SAFRA 14/15	VAR %
NORTE	2.560,2	40,6
NORDESTE	6.393,7	15,6
CENTRO-OESTE	39.491,4	12,7
SUDESTE	11.058,9	3,1
SUL	25.225,0	1,4
NORTE/NORDESTE	8.953,9	4,7
CENTRO-SUL	75.775,3	7,2
BRASIL	84.729,2	5,8

Fonte: adaptado de Conab.

Nota : estimativa em setembro 2015

O cultivo de milho destinado à produção de milho verde vem aumentando no Brasil de forma significativa, em função de sua lucratividade e maior diversificação de uso desse produto pelo mercado (PINHO et al., 2011). Podem ser classificados como milho verde todos os tipos de milho, colhidos e consumidos ainda frescos, enquanto os grãos estiverem macios e antes da total conversão do açúcar em amido. Dessa maneira, o ponto de colheita do milho verde é alcançado quando os grãos encontram-se no estado leitoso, apresentando de 60 a 80% de umidade (CANIATO et al., 2004). A composição

química do milho verde cru (em base úmida), segundo a TACO (2011), é de 63,5% de umidade, 28,6% de carboidratos, 6,6% de proteínas e 0,6% de lipídios.

Podem-se diferenciar os tipos de milho verde entre: milho verde comum, milho verde doce e o milho verde superdoce de acordo com seus teores de açúcares solúveis e amido presentes no endosperma. O milho verde doce difere do milho comum, não por características taxonômicas, mas pelo alto teor de açúcares e menor teor de amido. Na fase de grãos leitosos, isto é, milho verde, os grãos apresentam maior teor de açúcares em relação ao milho verde comum. Entre os açúcares encontrados no milho doce estão a glicose, frutose, galactose, sacarose, entre outros (KWIATKOWSKI e CLEMENTE, 2006).

O milho verde comum apresenta (em base seca) cerca de 3% de açúcares para 60 a 70% de amido, o milho verde doce apresenta 9 a 14% de açúcares para 30 a 35% de amido, já o milho verde superdoce apresenta em torno de 25% de açúcares para 15 a 25% de amido. A presença de alelos mutantes que bloqueiam a conversão de açúcares em amido, no endosperma, confere o caráter doce, explicando a razão de um tipo de milho possuir maior teor de açúcar e menor de amido do que outro tipo (KWIATKOWSKI e CLEMENTE, 2006).

1.2. A batata doce (*Ipomoea batatas*)

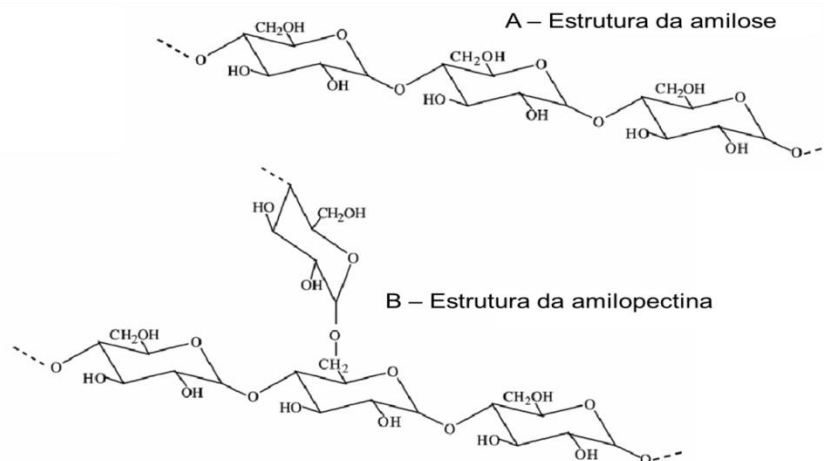
A batata-doce (*Ipomoea batatas*) é originária das Américas Central e do Sul. Trata-se de uma hortícula tipicamente tropical e subtropical, rústica, de fácil manutenção, boa resistência contra a seca e ampla adaptação. A cultura de batata doce está presente em 111 países, sendo a Ásia responsável por 90% da produção e a China o maior produtor mundial, com produção de 100 milhões de toneladas por ano (NUNES et al., 2012). A batata doce é a quarta hortaliça mais consumida no Brasil, porém nas últimas décadas houve queda na produção da batata doce no Brasil (de acordo com os dados apresentados pela EMBRAPA HORTALIÇAS (2008) seu cultivo está na sexta colocação dentre as hortaliças cultivadas no Brasil, em números de 500.000 toneladas por 48.000 hectares).

Fatores como a baixa tecnologia e o baixo investimento nessa hortaliça justificam a baixa produtividade de batata doce no Brasil. Segundo Nunes et. al. (2012), para os produtores, a cultura da batata doce é tida como uma renda extra, assim, esses não se especializam em tecnologias de melhoramento. No cultivo de batata doce no Brasil, não há compromisso por parte dos produtores, nem de incentivo por parte do Estado, gerando uma baixa adesão a esta cultura e associado à baixa lucratividade, levando os produtores a explorarem outros plantios mais rentáveis.

A batata doce tem grande potencial de ser explorada industrialmente, sendo uma hortaliça com alta concentração de amido. A reserva do amido da batata doce se encontra nos tubérculos da batata. A composição química das raízes da batata-doce, em base úmida, revela que esta é rica em carboidratos (principalmente amido) e apresenta teores de 13,4 a 29,2% de amido e 4,8 a 7,8% de açúcares redutores. Apresenta baixos teores de proteínas (2,0 a 2,9%) e de lipídios (0,3 a 0,8%), com umidade de 59,1 a 77,7% (ABUJAMRA, 2009).

1.3. O amido as enzimas amilolíticas (amilases)

O amido é o carboidrato mais abundante na natureza, sendo um homopolissacarídeo por conter apenas uma espécie monomérica em sua estrutura, ou seja, é formado por unidades de D-glicose. No amido existem dois tipos de polímeros de glicose que são: a amilose e a amilopectina (Figura 1). A amilose é um polissacarídeo de cadeias longas, não ramificadas resultante das ligações glicosídicas α 1-4 de peso molar entre 10^1 e 10^2 Kg/mol, enquanto que a amilopectina é altamente ramificada formada por ligações glicosídicas do tipo α 1-4 e do tipo α 1-6 apresentando peso molar entre 10^4 – 10^6 Kg/mol (KOBBLITZ, 2008).



Fonte SOUZA, et al. (2010) , modificado

Figura 1 - Estrutura química do amido. (A) Amilose, cadeia não ramificada de resíduos de D-glicose interligadas por ligações do tipo α (1-4). (B) Amilopectina, polímero ramificado de unidades D-glicose na cadeia principal as ligações glicosídicas são do tipo α (1-4), nos pontos de ramificação ocorrem as ligações do tipo α (1-6).

Em vegetais, o amido é encontrado em pequenos grânulos que se diferenciam, dependendo da espécie (KOBELITZ, 2008). A relação dos dois polissacarídeos (amilose e amilopectina) varia de acordo com a origem botânica do amido. Os amidos cerosos contêm menos de 15% de amilose, o amido normal tem 20-35% e os amidos com elevado teor de amilose tem aproximadamente 40% de amilose (ARAÚJO, 2008).

Segundo Araújo (2008), o teor de amilose em amido de batata-doce foi de 18%. E de acordo com Kwiatkowski e Clemente (2006), as porcentagens de amilose e amilopectina do milho doce foram, respectivamente, de 32,6% e 67,4%.

O amido vem sendo largamente utilizado pela indústria de alimentos como agente espessante e para outros fins. Pode ser utilizado de forma nativa ou após modificações físicas, químicas e enzimáticas. Modificações enzimáticas dão origem a maltodextrinas, dextrinas, xaropes de glicose, entre outros (ARAÚJO, 2008). As enzimas responsáveis por degradar o amido são biocatalizadores chamados amilases ou enzimas amilolíticas. As amilases tem grande emprego na indústria de alimentos, farmacêutica, têxtil e na produção de biocombustíveis (SOARES, et al., 2010).

As enzimas amilolíticas do grupo das α -amilases (EC 3.2.1.1) são responsáveis por hidrolisar as ligações α (1-4) do amido (amilose), tendo como produtos oligossacarídeos e glicose. Na liquefação do amido, processo decorrente da hidrólise pela α -amilase, ocorre perda da viscosidade da pasta de amido gelificada. A caracterização do amido nesse ponto também é perdida, pois a amilose que forma um complexo de coloração azul-escuro com o iodo, agora está hidrolisada (KOBLITZ, 2008; SOUZA, et al, 2010).

A β -amilase (EC 3.2.1.2) age sobre as ligações α (1-4) tendo como produto maltose, enquanto a glicoamilase (EC 3.2.1.3), também conhecida como amiloglicosidase (AMG), atua tanto em ligações α (1-4) quanto α (1-6) liberando glicose, ambas conferindo o sabor doce às preparações e sendo por essa razão conhecidas como enzimas de sacarificação (KOBLITZ, 2008).

Os cofatores são muito importantes para que ocorra o processo de hidrólise, e estes podem ser tanto metais como coenzimas. Para as amilases, o cálcio (Ca^{++}) é o cofator, sendo encontrado no milho doce “in natura” na concentração de 9 mg/100 g e na batata doce na concentração de 30 mg/100 g (KWIATKOWSKI e CLEMENTE, 2006).

Para facilitar a ação das amilases sobre o amido faz-se o processo de gelificação do amido em água quente. Quando aquecidos na presença de água, os amidos formam géis estáveis. O fenômeno de gelatinização do amido ocorre quando os grânulos são aquecidos em água à temperatura característica para cada fonte de amido, que varia de 68 a 74°C. Nesse processo, as pontes de hidrogênio que estabilizam a estrutura da amilose e amilopectina dentro dos grânulos são rompidas, a água entra e forma-se um gel de aparência translúcida (SINGH et al., 2012).

As enzimas amilolíticas para uso comercial são obtidas a partir de microrganismos (fungos, leveduras ou bactérias). A amiloglicosidase e a α -amilase são em sua maioria produzidas por microrganismos das espécies *Aspergillus* e *Bacillus* (NOROUZIAN, et al, 2006; PANDEY, et al., 2005).

1.4. Microrganismos produtores de amilases: *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*

Um grande achado das indústrias alimentícia e biotecnológica foi à produção de enzimas por meio de fungos filamentosos, pois estes apresentam uma alta produção de enzimas, participam no processo de fermentação e biodegradação de resíduos de baixo valor agregado e são de fácil manuseio e cultivo (MONCLARO, 2014). Os fungos filamentosos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* são micro-organismos GRAS (Generally Recognized As Safe), ou seja, reconhecidos como seguros para a produção de alimentos (MACHIDA et al., 2008; SCHUSTER et al., 2002).

O nome *Aspergillus niger* revela uma de suas características morfológicas que é a cor dos seus conidióforos (cor marrom escuro a preto). Suas colônias inicialmente apresentam cores esbranquiçadas a amareladas, porém ocorre um rápido crescimento de milhares de esporos escuros, o que torna as colônias pretas (SLIVINSKY, 2007). Dentre as vantagens de usar o *Aspergillus niger* estão à facilidade de cultivo, grande capacidade de utilizar matérias primas de baixo custo e um alto rendimento de enzimas produzidas. O *A. niger* é utilizado na produção de enzimas amiloglicosidase, alfa-amilase, β -galactosidases, pectinases, proteases, lipases e na produção de ácido cítrico (SCHUSTER et al., 2002).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo pertencente ao gênero *Aspergillus* seção *Flavi*. O *A. oryzae* foi isolado pela primeira vez em 1876 por H. Ahlburg, a partir do *koji*. Na Ásia é muito utilizado na produção do molho shoyo, sake, miso e de outros produtos, pois possui uma alta secreção enzimática (MONCLARO, 2014; ODA et al., 2006; PINTO, 2012). Um fato muito importante é que apesar de *A.oryzae* ser geneticamente muito similar ao *A. flavus*, ele não tem a capacidade de produzir aflatoxina ou quaisquer outros metabólitos cancerígenos (PINTO, 2012).

Aspergillus oryzae é conhecido pelo seu potencial de produção de várias enzimas, tais como amilases, beta-galactosidase, proteases, lipases, celulase, glutaminase e metalopeptidase. Com o sequenciamento do genoma do *A. oryzae*, quando se compara o genoma do *A. oryzae* com do *A. famigatus* e do

A. nidulans, pode se perceber um aumento de 2000 a 3000 genes, mantendo a mesma densidade gênica. Isso pode explicar o aumento da produção de enzimas, pois o *A. oryzae* na sua seleção provavelmente passou por vários ambientes em que era necessária uma eficiente hidrólise para obter os nutrientes essenciais (MONCLARO, 2014).

1.5. Bebidas alcoólicas oriundas de matérias-primas amiláceas

Bebidas alcoólicas oriundas de matérias-primas amiláceas são preparadas na América do Sul desde os tempos pré-colombianos. Os ameríndios preparavam diversas bebidas a partir de produtos amiláceos como milho e mandioca. No Brasil, a tiquira é uma aguardente de mandioca obtida pela destilação de seu mosto fermentado (CEREDA, 2005). Já a chicha é uma tradicional bebida fermentada do milho de baixa graduação alcoólica, que data da época dos incas, no período pré-hispânico, sendo até hoje popular em países como o Peru, Bolívia, Equador e Colômbia (HUAQUIRA, 2007). Alguns trabalhos descrevem a produção do cauim, uma bebida alcoólica fermentada elaborada pelos povos indígenas da Amazônia, obtida a partir de mandioca ou de milho (ALMEIDA, 2009; SANTOS, 2010).

Para produzir álcool a partir do amido, são necessárias as etapas de gelificação do amido com a posterior liquefação e sacarificação em açúcares simples, fermentação alcoólica e destilação. A necessidade de transformação de amido de mandioca em açúcares simples decorre do fato de que as leveduras de fermentação alcoólica como *Saccharomyces cerevisiae* não possuem enzimas amilolíticas (CEREDA, 2005).

Atualmente, os processos de fabricação das bebidas alcoólicas oriundas de matérias-primas amiláceas como chicha, cauim e tiquira são artesanais e não existe técnica de controle do processo, gerando desvantagens como baixo rendimento e produto final sem padrão de qualidade. Para alterar esse panorama, os processos devem ser modernizados, com aplicação de tecnologia de fermentação (CEREDA, 2005; HUAQUIRA, 2007; SANTOS, 2010).

1.6. Produção de bebidas destiladas

Após o mosto ser fermentado, obtém-se o fermentado alcoólico que é composto principalmente por água e etanol, em porcentagens que podem variar de 88 a 93% e 7 a 12%, respectivamente. Para separar e concentrar o etanol a partir do fermentado alcoólico, faz-se a destilação. A destilação é o processo de aquecer o fermentado alcoólico promovendo a volatilização, resfriamento dos vapores e condensação dos compostos voláteis. A volatilização se baseia na temperatura de ebulição desses compostos, assim, o composto que se volatiliza primeiro é o que tem o menor ponto de ebulição. O resíduo líquido que não volatiliza é chamado de vinhoto ou vinhaça, sendo composto principalmente por água, sais minerais, sólidos do mosto, leveduras, ácidos orgânicos e inorgânicos (LIMA et al., 2001; SORATTO, 2007).

A bebida destilada compõe-se de água e álcool etílico em maiores proporções. E a fração minoritária é composta pelos “componentes secundários” ou congêneres, substâncias essas responsáveis pelo sabor e aroma das aguardentes. Os principais componentes secundários são: aldeído acético, ácido acético e ésteres desses ácidos, furfural e álcoois superiores. A fração álcool não volátil é basicamente representada pelo teor de álcoois superiores como o amílico, isoamílico, butílico, isobutílico, propílico e isopropílico. Os álcoois superiores são quantitativamente o maior grupo de compostos responsáveis pelo aroma em todos os destilados (CAMPOS, 2011; CANCELIER et al., 2013; MOREIRA et al., 2012).

No processo de destilação, o destilado é dividido em frações chamadas de “cabeça”, “coração” e “cauda”. Os componentes voláteis do mosto fermentado possuem diferentes graus de volatilidade, o que possibilita a separação dos mesmos através do processo de destilação (MAIA e CAMPELO, 2005).

A fração “cabeça” é a primeira porção a ser destilada, correspondendo a 1 a 10% do volume total do destilado e ao redor de 1 a 2% do volume total do fermentado alcoólico, podendo passar de 65°GL. São componentes característicos da cabeça o metanol, os aldeídos (aldeído acético) e os ésteres (acetato de etila). A não separação da fração da cabeça pode acarretar em destilados com alto teor de metanol e aldeído acético que são tóxicos e tem

limite máximo estabelecido na legislação (ALCARDE et al., 2010; CANCELIER et al., 2013; MAIA e CAMPELO, 2005; SOUZA et al., 2013).

Em seguida, a fração “coração” corresponde a 80% do destilado total e até 16% do volume total do fermentado alcoólico, dependendo do teor alcoólico que se deseja para o destilado e da concentração de álcool do fermentado alcoólico. Esta é a fração desejada e que tem os componentes que lhe dão a melhor qualidade e tendo o maior volume dentre as frações, geralmente com graduação alcóolica de 38 a 40%. A fração “cauda” quando separada corresponde a 10% do destilado total e ao redor de 3% do volume total do fermentado alcoólico e contém ácidos voláteis e álcoois superiores, com graduação alcóolica de 14 a 15% (ALCARDE et al., 2010; CANCELIER et al., 2013; MAIA e CAMPELO, 2005; SOUZA et al., 2013).

A maioria dos produtores de bebidas destiladas realiza o processo de destilação em uma etapa única (destilação simples). Outro processo que pode ser realizado é o da bidestilação da aguardente. No processo de bidestilação, a primeira destilação é geralmente conduzida até que o destilado apresente um teor alcoólico entre 25 e 27°GL. Esse primeiro destilado é então submetido a uma nova destilação, onde são separadas as frações cabeça, coração e cauda. A fração coração, neste caso, apresenta um teor alcoólico maior do que a fração correspondente da bebida destilada obtida pela forma tradicional. Esta fração pode ser consumida após ser diluída ou envelhecida (ALCARDE et al., 2009).

Os processos de produção de conhaque e uísque utilizam metodologias de bidestilação, sendo estas, mais indicadas quando se visa à qualidade química e sensorial do destilado final. No trabalho Alcarde et al. (2009) foi realizada uma comparação entre a destilação simples e a bidestilação de aguardentes de cana-de-açúcar. As aguardentes bidestiladas apresentaram maior qualidade final, com redução dos teores de cobre, acidez volátil, aldeídos, ésteres e metanol.

1.7. Análises físico-químicas do destilado

Para obter uma aguardente de qualidade e dentro dos padrões da legislação, faz-se necessário as análises físico-químicas do produto. É de

responsabilidade do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovar regulamentos técnicos a fim de garantir a qualidade por meio de fixação de padrões de identidade das aguardentes de cana de açúcar e outras (BRASIL, 2009; BRASIL, 2008; BRASIL, 2005).

Algumas substâncias são indesejáveis nas bebidas destiladas, devido a sua alta toxicidade e potencial carcinogênico. As principais substâncias, também denominadas contaminantes, que oferecem perigo para a saúde humana e que podem comprometer a qualidade sensorial de bebidas destiladas podem ter origem orgânica (álcool butílico, álcool sec-butílico, acroleína, carbamato de etila, diacetil e metanol) ou inorgânica (arsênio, chumbo e cobre) (ALVARENGA, 2011).

Foram definidos recentemente, novos padrões aceitáveis de qualidade da aguardente de cana de açúcar, referentes a alguns contaminantes, que antes não estavam definidos em legislações, como o carbamato de etila (150 µg.L), acroleína (5 mg.100 mL de álcool anidro), álcool sec-butílico (10 mg.100 mL⁻¹de álcool anidro), álcool n-butílico (3 mg.100 mL⁻¹de álcool anidro), chumbo (200 µg.L⁻¹) e arsênio (100 µg.L⁻¹) (BRASIL, 2009).

A Tabela 2 apresenta os componentes químicos e seus limites estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2005) para a qualidade da aguardente de cana- de açúcar.

Tabela 2 – Componentes químicos e seus valores mínimos e máximos estabelecidos pela legislação brasileira para fins de qualidade da aguardente de cana- de açúcar.

Componente	Unidade	Limite mínimo	Limite máximo
Acidez volátil, em ácido acético	mg / 100mL álcool anidro	-	150
Ésteres totais em acetato de etila	mg / 100mL álcool anidro	-	200
Aldeídos totais em aldeído acético	mg / 100mL álcool anidro	-	30
Furfural + Hidroximetilfurfural	mg / 100mL álcool anidro	-	5
Álcoois superiores*	mg / 100mL álcool anidro	-	360
Coefficiente de congêneres **	mg / 100mL álcool anidro	200	650
Álcool metílico	mg / 100mL álcool anidro	-	20
Cobre	mg / L ⁻¹ da bebida	-	5
Carbamato de etila	µg / L ⁻¹ da bebida	-	150
Chumbo	µg / L ⁻¹ da bebida	-	200

*Álcoois superiores= soma dos álcoois isobutílico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol).

** Coeficiente de congêneres = soma da acidez volátil, aldeídos, ésteres totais, furfural e hidroximetilfurfural e álcoois superiores. Fonte : BRASIL,2005a.

A presença de metanol (álcool metílico) em bebidas destiladas não é desejada, pelo fato deste ser tóxico, podendo causar cegueira e morte em casos mais graves. O efeito da cegueira é causado pela oxidação do metanol a ácido fórmico e gás carbônico com reações de acidose grave e toxicidade, coma e morte pela depressão do sistema respiratório. O metanol origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo normalmente presente nas frutas. Um aspecto relevante na produção de aguardente de frutas é o alto teor de metanol encontrado em algumas destas bebidas. Nestes destilados, este composto é resultante da hidrólise enzimática da pectina presente nas frutas pela pectina metilesterase (EC 3.1.1.11) (ALVARENGA, 2011; HANG et al., 2008; MOREIRA et al., 2012).

O carbamato de etila (EtOCONH_2) é um éster etílico do ácido carbâmico e apresenta solubilidade tanto em água quanto em álcool. O carbamato de etila é um composto considerado potencialmente carcinogênico, no entanto, é encontrado em pequenas quantidades em alimentos fermentados como pães e iogurte e em bebidas destiladas. A ocorrência do carbamato de etila no destilado pode ser explicada por interações do etanol com ureia, fosfato de carbamila e cianeto. O Canadá foi o primeiro país que estabeleceu uma legislação específica para o carbamato de etila, e tornou-se referência para os Estados Unidos e para a Comunidade Europeia, que também estabeleceram o limite de $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ (MIRANDA et al., 2007; SOUZA et al., 2013).

Na cachaça, o furfural e o hidroximetilfurfural são aldeídos resultantes de processos relacionados do processo de destilação quando ainda há presença de açúcares ou quando se destila o mosto ainda com substâncias ainda em suspensão. O furfural é um componente orgânico indesejável na aguardente, uma vez que é nocivo ao organismo e afeta o sabor e aroma da bebida devido às características organolépticas picantes típicas dos aldeídos. A queima da palha da cana-de-açúcar gera diversos compostos, dentre eles o furfural, que possivelmente são transferidos da cana queimada para a aguardente durante o processo de produção. Além disso, a presença de compostos não voláteis no vinho, a pirolisação da matéria orgânica depositada no fundo do alambique e a condução inadequada da temperatura de destilação influenciam na síntese do furfural (SCHMIDT et al., 2009).

O cobre em níveis traço é essencial ao organismo para o bom funcionamento do organismo, sendo prejudicial quando em excesso. O cobre presente na aguardente é proveniente da destilação em alambique de cobre. Quando o alambique não passa por um processo correto de limpeza, este apresenta o “azinhavre” $[\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2]$, um produto da oxidação do cobre que é dissolvido na aguardente pelo vapor alcóolico ácido no processo de destilação. O uso do cobre nos destiladores é justificado por ser um metal catalizador e não causar o odor indesejável do dimetil sulfeto produzido com o uso de destiladores de aço inoxidável. O limite estabelecido de cobre em aguardente é de 5 mg/L^{-1} (AZEVEDO et al., 2003; MIRANDA et al. 2007; SOUZA et al., 2013).

2. Objetivo geral

O presente trabalho de pesquisa tem como principal objetivo o estudo da hidrólise do amido de milho verde e da batata doce, com uso de enzimas amilolíticas fúngicas para a produção de aguardente.

2.1 Objetivos específicos

- Estudar a hidrólise enzimática dos amidos de milho verde e batata doce com o uso separado e combinado dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*.
- Estudar a hidrólise dos amidos de milho verde e batata doce com uso dos fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e amiloglicosidase comercial.
- Realizar a fermentação dos mostos hidrolisados com levedura comercial para obtenção dos fermentados alcoólicos.
- Realizar a destilação dos fermentados alcoólicos para obtenção das aguardentes de milho verde e batata doce.
- Realizar as análises físico-químicas dos mostos, fermentados alcoólicos e aguardentes.

3. Justificativa

As culturas do milho verde e da batata doce são muito populares no Brasil, sendo cultivadas em todas as regiões do país. A aquisição de matérias-primas abundantes e de baixo custo aliada ao conhecimento do processo de hidrólise enzimática dos amidos em açúcares fermentescíveis, permite obter processos de transformação destas matérias-primas em bebidas destiladas. No entanto, o processo de fabricação das bebidas alcoólicas destiladas necessita de aplicação de tecnologia de fermentação, pois no mercado das aguardentes de qualidade, a legislação está cada vez mais exigindo que o processo de fabricação seja baseado em práticas criteriosamente determinadas para a obtenção de um produto final padronizado e de qualidade. A produção de destilados de matérias-primas como o milho verde e a batata doce pode beneficiar os produtores rurais e incentivar a cadeia produtiva, pois resulta em produtos de alto valor agregado.

4. Materiais e métodos

4.1. Microrganismos e manutenção das cepas

Foram utilizadas as cepas dos fungos filamentosos *Aspergillus oryzae*, (Ahlburg) Cohn n° CCT: 3940 ou ATCC 12891 e *Aspergillus niger* van Tieghem (variedade awamori) n° CCT: 3941 ou ATCC 22342, adquiridas na Fundação André Tosello (Coleção de Culturas Tropicais). Os fungos foram conservados sob-refrigeração a 8°C em meio ágar Sabouraud dextrose, sendo repicados a cada três meses. O repique foi feito em tubos de ensaio contendo o meio ágar Sabouraud dextrose inclinado, com a ajuda de uma alça metálica. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 24°C durante 5-7 dias. Após este tempo, os tubos foram mantidos sob-refrigeração.

4.2. Obtenção dos fungos e amilases usados na hidrólise enzimática

O meio para produção inicial dos fungos foi constituído por 50 mL do Agar Sabouraud dextrose distribuído de forma inclinada em frascos erlenmeyers de 250 mL. Após solidificação do meio, os microrganismos (*Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger*) foram repicados no meio. Após o crescimento dos fungos, incubados a 24°C por 5 a 7 dias, a biomassa formada na superfície do meio foi raspada com auxílio de uma espátula, adicionando-se 30 mL de água destilada estéril, para obter uma solução de esporos. Foram utilizados 3-4 mL dessa solução de inóculo para cada 25 g de meio de cultivo.

Como meio de cultivo no processo de fermentação no estado sólido (FES) para obtenção dos fungos e das amilases por eles secretadas foi utilizado farinha grossa de arroz (Figura 2). A FES foi conduzida em erlenmeyer de 250 mL contendo 25 g de meio de cultivo e água destilada (100 mL) em quantidade suficiente para umedecer o substrato sem deixar água aparente, após autoclavagem. Todos os erlenmeyers foram autoclavados a 121°C por 20 min. Após o resfriamento, cada meio foi inoculado com uma suspensão de esporos (3 a 4 mL, 10^5 - 10^6 esporos/g) e o material inoculado foi incubado à 24°C por 7 dias. Após crescimento dos fungos foi obtido uma suspensão de

fungos e amilases, com adição de 100 mL de água destilada. Essa suspensão foi bem homogeneizada com bastão de vidro.

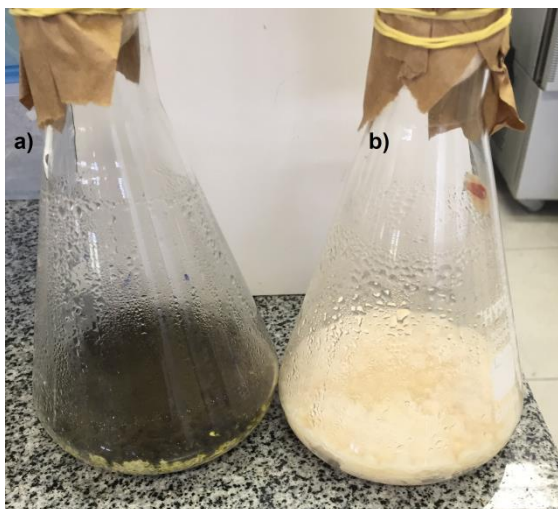


Figura 2 - Foto da fermentação no estado sólido utilizando farinha grossa de arroz para obtenção dos fungos e das amilases a) *Aspergillus niger* e b) *Aspergillus oryzae*

4.3. Preparo das matérias-primas

As raízes de batata doce (cultivar Brazlândia Roxa) e as espigas de milho verde foram obtidas em supermercados locais da cidade de Brasília no período de Abril a Agosto de 2015. No laboratório, as matérias primas foram sanitizadas em hipoclorito de sódio e lavadas em água corrente antes do uso. Para o preparo da solução de batata doce a ser hidrolisada, 250 g de batata doce foi cortada em pedaços, cozida em micro-ondas, descascada, adicionada de 250 mL de água e triturada com uso de liquidificador. Para o preparo da solução de milho verde a ser hidrolisada, 250 g de grãos de milho verde obtidos das espigas foram adicionados de 250 mL de água e triturados com uso de liquidificador. Essa solução foi filtrada em peneira para remoção do bagaço e depois foi cozida em micro-ondas. O processo de cozimento das matérias primas é necessário para que ocorra a gelificação do amido.

4.4. Processo de hidrólise (liquefação e sacarificação) dos amidos de batata doce e milho verde

Para o processo de hidrólise do amido de batata doce, 500 ml de solução de batata doce gelificada (preparada conforme descrito no item 4.3) foi adicionada de 100 mL da suspensão de fungos e amilases (preparada conforme descrito no item 4.2). Já para o processo de hidrólise do amido de milho verde, 500-700 mL de solução de milho verde gelificada (preparada conforme descrito no item 4.3) foi adicionada de 100 mL da suspensão de fungos e amilases (preparada conforme descrito no item 4.2). As misturas foram mantidas por 12 h em banho-maria a 45°C.

Foram realizados testes de hidrólise para definir a melhor metodologia. Assim, os amidos de batata doce e de milho verde foram incubados com o uso separado e combinado dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. Também foi estudada a hidrólise dos amidos com uso do *Aspergillus oryzae* e amiloglicosidase comercial e do *Aspergillus niger* e amiloglicosidase comercial. A dosagem de amiloglicosidase comercial (AMG 300 L, Novozymes) foi de 0,8 mL para cada 500 mL de solução a ser hidrolisada (conforme recomendação do fabricante). Em todos os testes, foi determinado durante o processo de hidrólise, o grau Brix inicial (tempo zero) e final (após 12 h de incubação em banho-maria a 45°C) das soluções de batata doce e de milho verde.

4.5. Fermentação alcoólica

Todos os mostos hidrolisados foram fermentados com levedura *S. cerevisiae* comercial da marca FERMENTIS (FERMENTO S-04). A dosagem utilizada foi baseada na informação de que 11,5 g de leveduras fermentam 20 litros de mosto. Antes de inocular o fermento no mosto, procedeu-se a reidratação da levedura seca. Para isso misturou-se o levedo seco em um volume de 10 vezes seu próprio peso com água destilada, por cerca de 10 minutos. A temperatura de fermentação foi mantida a 24°C e o processo de fermentação durou 5 dias. Concluída a etapa fermentativa, o meio fermentado foi filtrado para a separação do bagaço

4.6. Análises físico-químicas do mosto hidrolisado e do fermentado alcoólico de milho e de batata doce

O pH foi determinado em pHmetro digital (AOAC, 2006). A acidez total foi determinada através da titulação com NaOH 0,1 N (IAL, 1985). A acidez volátil foi determinada através de arraste de vapor de água e posteriormente titulação com NaOH 0,1 N (IAL, 1985). O teor de sólidos solúveis (grau Brix) foi determinado por refratômetro de bancada. Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ADNS ou ácido 3-5 dinitrossalicílico (MILLER, 1959).

4.7. Destilação do fermentado alcoólico de milho e de batata doce

O líquido fermentado foi destilado em um destilador de laboratório, com capacidade para 1 litro (Figura 3). A destilação teve a temperatura monitorada, sendo mantida entre 80 a 94°C. A primeira destilação prosseguiu sem separação de frações. Nesta primeira etapa o destilado se refere a todo o volume de álcool extraído do mosto fermentado e geralmente apresenta entre 27 e 32°GL. Este volume extraído foi armazenado em um recipiente, até que se tivesse volume suficiente para uma segunda destilação. O volume restante, sem a presença de álcool foi descartado.

Na segunda destilação foram separadas as frações de cabeça (1-2% do volume teórico inicial do destilado), coração (80% do volume teórico do destilado) e cauda (10% do volume teórico final do destilado). As frações da aguardente foram armazenadas sob refrigeração em recipientes adequados e, posteriormente, foram feitas as análises físico-químicas (Figura 4).



Figura 3 – Foto do destilador de laboratório

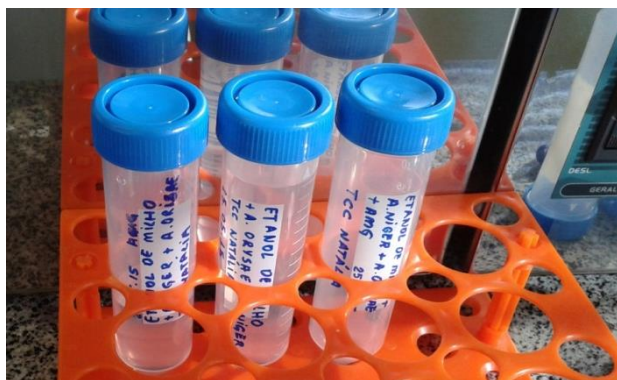


Figura 4 – Foto dos tubos falcon contendo a aguardente de milho verde e de batata doce

4.8. Análises do destilado de milho verde e de batata doce

O grau alcoólico foi determinado com uso de alcoômetro de Gay-Lussac colocado diretamente em volume de destilado a 20°C (IAL, 1985). A acidez total, fixa e volátil foi determinada de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). As análises de furfural, metanol, aldeídos, ésteres e álcoois superiores foram determinadas por cromatografia gasosa (BORTOLETTO e ALCARDE, 2013). As frações cabeça e fração coração da aguardente de mandioca foram analisadas no Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, USP, Piracicaba, SP).

5. Resultados e discussão

5.1. Testes de hidrólise dos amidos de milho verde e de batata doce com o uso dos fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e amiloglicosidase comercial

Para o processo de hidrólise do amido de batata doce e do amido de milho verde, foram realizados vários testes para escolher o processo mais eficiente. Em todos os testes, os teores de sólidos solúveis (grau Brix) inicial (tempo zero) e final (após 12 h de incubação) das soluções foram determinados por refratômetro de bancada. Os maiores teores de sólidos solúveis foram obtidos quando se utilizou a amiloglicosidase comercial (Tabela 3).

Tabela 3 - Teores de sólidos solúveis (grau Brix) inicial e final das soluções de milho verde e de batata doce durante o processo de hidrólise com o uso dos fungos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e amiloglicosidase comercial (AMG)

Matéria prima	Grau Brix das soluções									
	<i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i>		<i>A. oryzae</i> e <i>A. niger</i>		<i>A. oryzae</i> e AMG		<i>A. niger</i> e AMG	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Batata doce	5,0	8,0	5,0	8,5	5,2	8,1	8,9	11,6	8,2	11,0
Milho verde	5,0	6,2	4,7	6,3	3,5	7,3	6,0	11,6	5,2	12,0

Segundo PANDEY et al. (2005), a associação das enzimas amilolíticas α -amilase e amiloglicosidase tem um efeito sinérgico. A ação das mesmas sobre as ligações glicosídicas do amido para a liberação de glicose chega a ser duas vezes maior que do que a atividade de cada uma individualmente. A α -amilase e a amiloglicosidase agem na superfície dos grânulos de amido. A α -amilase expõe cadeias não redutoras para a ação das amiloglicosidase e estas por sua vez também agindo nas superfícies liberam continuamente glicose, expondo novos substratos para a ação das α -amilases. No trabalho de

ABUJAMRA (2009), para a produção de destilado alcoólico de batata-doce verificou-se também a ação em conjunto dessas duas enzimas e observou-se que os melhores resultados de hidrólise foram obtidos quando se utilizou uma menor concentração de α -amilase comercial (0,5 g de α -amilase para 1 Kg de farinha de batata doce) e uma maior concentração de AMG (2,0 g de AMG para 1 Kg de farinha de batata doce).

O fungo *Aspergillus oryzae* tem capacidade de produzir boas quantidades de alfa amilase, especialmente quando cultivado por FES. A produção de alfa amilase por *A. oryzae* tem sido bastante estudada e o uso da mesma para produção comercial está bem estabelecido (FRANCIS et al. 2002). Já o fungo *Aspergillus niger* é um produtor de alfa amilase e amiloglicosidase, sendo a enzima comercial amiloglicosidase AMG 300 L (Novozymes) produzida a partir deste fungo (NOROUZIAN et al., 2006). A introdução do *A. niger* neste estudo se baseou na hipótese deste fungo aumentar a hidrólise dos amidos de batata doce e milho verde pela produção de amiloglicosidase, porém não se verificou grande diferença nos resultados com uso do *A. niger* ou com o uso combinado dos dois fungos (*A. oryzae* e *A. niger*).

A Tabela 4 apresenta os resultados do pH e dos açúcares redutores determinados por ADNS dos mostos de batata doce e milho verde obtidos com o uso dos fungos *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger* e amiloglicosidase comercial (AMG).

Tabela 4 - Análises dos mostos hidrolisados com uso dos fungos *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger* e amiloglicosidase comercial (AMG)

Análises	Mostos Hidrolisados			
	Batata doce		Milho Verde	
	<i>A. oryzae</i> e AMG	<i>A. niger</i> e AMG	<i>A. oryzae</i> e AMG	<i>A. niger</i> e AMG
Sólidos solúveis (°Brix)	11,60	11,00	11,60	12,00
Açúcares redutores (%)	9,10	9,08	8,70	9,88
pH	5,50	4,60	6,48	4,29

No presente estudo, a solução de batata doce gelificada apresentou pH de 6,08 e o mosto de batata doce apresentou pH de 5,50 (*A. oryzae*) e 4,60 (*A.*

niger). Já a solução de milho verde gelificada apresentou pH de 7,12 e o mosto de milho verde apresentou pH de 6,48 (*A. oryzae*) e 4,29 (*A. niger*). Tanto *A. niger* quanto *A. oryzae* são produtores de ácidos orgânicos, o que explica a redução do pH dos mostos. *A. niger* é usado comercialmente para produção de ácido cítrico, com capacidade de produzir grandes quantidades desse ácido quando cultivado em fermentação submersa (SCHUSTER et al., 2002) e *A. oryzae* é um produtor de ácido kojico (BATLEY, 2006; BURDOCK et al., 2001). A redução do pH pela produção de ácidos orgânicos pelos fungos reduz o risco de contaminação do mosto por bactérias acéticas ou lácticas, que aumentam o teor de acidez volátil (ácido acético) e são indesejáveis no processo de fermentação alcoólica.

Neste trabalho, os mostos hidrolisados apresentaram de 11,00 a 12,00°Brix e de 8,70 a 9,88% de açúcares redutores, que são os açúcares fermentescíveis como glicose e maltose. A introdução da AMG aumentou a quantidade de açúcares redutores nos mostos hidrolisados em comparação com o trabalho de SOUZA (2014), onde o mosto de mandioca hidrolisado com *A. oryzae* apresentou 13,03°Brix e 6,80% de açúcares redutores.

A partir dos resultados obtidos ficou definido usar na hidrólise da batata doce e do milho verde, a solução de fungo *Aspergillus oryzae* (produtor de alfa amilase) e a enzima comercial amiloglicosidase AMG 300 L.

5.2. Produção da aguardente de batata doce

Para a hidrólise da batata doce utilizou-se 2,5 Kg de batata doce que foi gelificada, acondicionada em porções de 500 mL e adicionada da solução de 100 mL de fungo *Aspergillus oryzae* e 0,8 mL de AMG. Após 12 horas de incubação a 45°C, foi obtido um total de 6,7 litros de mosto hidrolisado sem filtrar. A Tabela 5 apresenta as análises físico-químicas da solução de batata doce gelificada e do mosto hidrolisado.

Tabela 5 - Análises físico-químicas da batata doce e do mosto de batata doce

Análises	Batata doce	Mosto de batata doce
pH	6,45 ± 0,01	----
Sólidos solúveis (°Brix)	9,60 ± 0,01	13,01 ± 0,50
Açúcares redutores (%)	5,42 ± 0,14	----

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão das medidas em triplicata.

Neste trabalho, a solução de batata doce gelificada apresentou 9,60°Brix e 5,42% de açúcares redutores. Segundo ABUJAMRA (2009), as raízes frescas da batata doce são ricas em carboidratos (amido principalmente), com teores de 13,4 a 29,2% e apresentam teores de açúcares redutores de 4,8 a 7,8%. O teor de sólidos solúveis de 13,01°Brix do mosto mostrou que parte do amido da batata doce foi hidrolisada em açúcares fermentescíveis. Na produção de cachaça, os melhores resultados fermentativos são obtidos com mostos na concentração de 14 a 16°Brix (VENTURINI FILHO e NOGUEIRA, 2013).

Para a etapa de fermentação alcoólica, 6,7 litros de mosto de batata doce a 13,01°Brix foi adicionado de 3,85 g de levedura reidratada. A fermentação alcoólica foi realizada por 5 dias a 24°C. Concluída a etapa fermentativa, o mosto fermentado foi filtrado para a separação do bagaço e rendeu um volume de 5,2 litros de fermentado alcoólico. A tabela 6 apresenta as análises físico-químicas do fermentado alcoólico de batata doce.

Tabela 6 - Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de batata doce

Análises	Valores
pH	3,62 \pm 0,05
Sólidos solúveis (°Brix)	4,30 \pm 0,30
Acidez total (meq/L)	73,50 \pm 0,05
Acidez volátil (meq/L)	1,00 \pm 0,01

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão das medidas em triplicata.

No presente estudo, houve decréscimo do pH de 6,45 (solução de batata doce) para 3,62 (fermentado alcoólico de batata doce) e diminuição dos sólidos solúveis de 13,01°Brix (mosto de batata doce) para 4,30°Brix (fermentado alcoólico de batata doce). Os resultados podem ser comparados com o estudo de CARVALHO et al. (2008), onde o fermentado alcoólico de cana de açúcar apresentou decréscimo de pH de 5,2 para 3,6 e diminuição de sólidos solúveis de 15,0 para 4,0°Brix.

O baixo valor de acidez volátil (1,00 meq/L) mostra que o fermentado alcoólico de batata doce foi tecnologicamente bem elaborado. A acidez volátil encontra-se muito abaixo dos padrões estabelecidos pela legislação para vinhos de mesa, sendo o máximo permitido de 20 meq.L⁻¹ (BRASIL, 1988).

Na etapa de destilação do fermentado alcoólico para obtenção da aguardente de batata doce, a primeira destilação prosseguiu sem separação de frações e o destilado apresentou teor alcoólico de 30°GL. Foram destilados 5,2 litros de fermentado alcoólico e obteve-se volume de 500 mL de destilado (rendimento de 9,91% em relação volume total de fermentado alcoólico). Na segunda destilação foram separadas as frações cabeça, coração e cauda. A fração coração rendeu volume de 270 mL (rendimento de 5,19% em relação volume total de fermentado alcoólico) e apresentou teor alcoólico de 65°GL (Tabela 7).

Tabela 7 - Análises físico-químicas do destilado de batata doce (fração coração)

Análises	Valores
Grau alcoólico (°GL)	65,00 ± 0,01
Acidez total (mg ácido acético/100 mL)	0,165 ± 0,02
Acidez fixa (mg ácido acético/100 mL)	0,024 ± 0,01
Acidez volátil (mg ácido acético /100 mL)	0,002 ± 0,01

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão das medidas em triplicata.

O teor alcoólico da aguardente de batata doce (65°GL) está acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira para as aguardentes que é de 38 a 54°GL (BRASIL, 2008). O alto teor alcoólico da aguardente se deve ao processo de bidestilação, sendo possível uma diluição para a graduação característica deste tipo de bebida que é em torno de 40°GL. Para reduzir o teor alcóolico a 40°GL, podem ser adicionadas 62,5 mL de água destilada, perfazendo um volume de 332,5 mL de aguardente (RIZZON e MENEGUZZO, 2006). Assim, o rendimento em relação à matéria prima foi de 13,3 litros da aguardente a 40°GL para cada 100 Kg de batata doce. Segundo Souza et al. (2013) o rendimento médio da cachaça é 100 litros de cachaça por tonelada de cana de açúcar, ou seja, 10 litros de cachaça por 100 kg de cana de açúcar.

A acidez volátil da aguardente de batata doce (0,002 mg/100 ml) ficou muito abaixo do permitido pela legislação brasileira para aguardentes que é de no máximo 150 mg/100 mL (BRASIL, 2008). O ácido acético é o componente secundário de maior responsabilidade pela acidez volátil da aguardente. A alta acidez volátil é indicativa de contaminação microbiana advinda do processo ou de falha no recolhimento da fração (coração) ideal do destilado (ALVES, 2011; ASQUIERI et al., 2009).

5.3. Produção da aguardente de milho verde

Na produção da aguardente de milho verde, durante o cultivo por FES na farinha grossa de arroz do fungo *A. oryzae*, houve contaminação com o fungo *A. niger* (Figura 5). Como os dois fungos são GRAS e produtores de amilases e a técnica de co-cultivo de fungos é descrita como benéfica para a indução de maior excreção de enzimas (HU et al., 2011) decidiu-se usar essa solução dos 2 fungos para o processo de hidrólise do amido do milho verde.

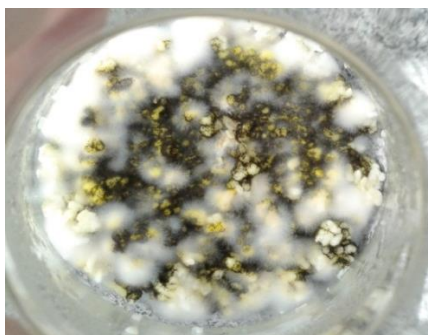


Figura 5 – Foto da fermentação no estado sólido utilizando farinha grossa de arroz com os fungos *A. oryzae* e *A. niger*

Para a hidrólise do milho verde utilizou-se 2,5 Kg de milho verde doce que foi gelificado, acondicionado em porções de 500-700 mL e adicionado da solução de 100 mL de fungos *A. oryzae* e *A. niger* e 0,8 mL de AMG. Após 12 horas de incubação a 45°C, foi obtido um total de 6,8 litros de mosto hidrolisado sem filtrar. A Tabela 8 apresenta as análises físico-químicas da solução de milho verde e do mosto hidrolisado. A solução de milho verde gelificada apresentou 8,10°Brix e o mosto do milho verde apresentou

11,10°Brix, mostrando que parte do amido foi hidrolisado em açúcares fermentescíveis.

Tabela 8 - Análises físico-químicas do milho verde e do mosto de milho verde.

Análises	Milho verde	Mosto de milho verde
pH	---	4,33 ± 0,08
Sólidos solúveis (°Brix)	8,10 ± 0,01	11,10 ± 0,05
Açúcares redutores (%)	---	7,23 ± 0,43

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de medidas triplicata

Para a etapa de fermentação alcoólica, 6,8 litros de mosto de milho verde a 11,10°Brix foi adicionado de 3,91 g de levedura reidratada. A fermentação alcoólica foi realizada por 5 dias a 24°C. Concluída a etapa fermentativa, o mosto fermentado foi filtrado para a separação do bagaço e rendeu um volume de 5,5 litros de fermentado alcoólico. A tabela 9 apresenta as análises físico-químicas do fermentado alcoólico de milho verde.

Tabela 9 - Análises físico-químicas do fermentado alcoólico de milho verde

Análises	Valores
pH	4,13 ± 0,01
Sólidos solúveis (°Brix)	2,60 ± 0,05
Acidez total (meq/L)	48,00 ± 0,05
Acidez volátil (meq/L)	1,00 ± 0,01

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão das medidas em triplicata.

No presente estudo, o fermentado alcoólico de milho verde apresentou pH de 4,13 e 2,60°Brix, podendo ser comparado aos resultados obtidos por Paschoalini e Alcarde (2009), onde o fermentado alcoólico de cana de açúcar apresentou pH de 4,50 e 2,96 °Brix, mostrando que quase todo os açúcares solúveis foram consumidos na fermentação. O baixo teor de acidez

volátil é indicativo de que a fermentação não sofreu contaminação por bactérias acéticas (ALCARDE et al., 2009).

Na etapa de destilação do fermentado alcoólico para obtenção da aguardente de milho verde, a primeira destilação prosseguiu sem separação de frações e o destilado apresentou teor alcoólico de 27°GL. Foram destilados 5,5 litros de fermentado alcoólico e obteve-se volume de 500 mL de destilado (rendimento de 9,09% em relação volume total de fermentado alcoólico). Na segunda destilação foram separadas as frações cabeça, coração e cauda. A fração coração rendeu volume de 210 mL (rendimento de 3,81% em relação volume total de fermentado alcoólico) e apresentou teor alcoólico de 51°GL (Tabela 10).

Tabela 10 - Análises físico-químicas do destilado de milho verde (fração coração)

Análises	Valores
Grau alcoólico (°GL)	51,00 ± 0,01
Acidez total (mg ácido acético/100 ml)	0,03 ± 0,01
Acidez fixa (mg ácido acético/100 ml)	0,03 ± 0,01
Acidez volátil (mg ácido acético /100 ml)	0,00

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão das medidas em triplicata.

O rendimento em relação à matéria prima foi de 8,4 litros da aguardente de a 51°GL para cada 100 Kg de milho verde. Esse resultado pode ser comparado ao rendimento da grapa (aguardente de bagaço de uva), onde se utilizam 100 kg de bagaço de uva para cada 10 litros de grapa a 50°GL (RIZZON e MENEGUZZO, 2006).

5.4. Análises por cromatografia gasosa da fração coração das aguardentes de batata doce e milho verde

A tabela 11 apresenta os resultados das análises cromatográficas das frações coração das aguardentes de batata doce e milho verde, realizadas no Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, USP, Piracicaba, SP).

Tabela 11 - Análises cromatográficas das frações coração das aguardentes de batata doce e milho verde

Análises	Batata doce	Milho verde	Valores de referência
Grau alcoólico real a 20°C (v/v)	62,89	51,18	38-54
Acidez volátil em ácido acético (mg/100mL álcool anidro)	5,26	0,10	0-150
Aldeídos em aldeído acético (mg/100mL álcool anidro)	16,01	13,81	0-30
Ésteres em acetato de etila (mg/100mL álcool anidro)	22,61	14,71	0-200
Álcool metílico (mg/100mL álcool anidro)	182,86	19,91	0-20
Álcool sec-butanol (mg/100mL álcool anidro)	0,00	0,00	-
Álcool propílico (mg/100mL álcool anidro)	33,52	54,92	-
Álcool iso-butílico (mg/100mL álcool anidro)	123,77	181,54	-
Álcool n-butílico (mg/100mL álcool anidro)	7,71	0,31	-
Álcool iso-amílico (mg/100mL álcool anidro)	175,61	259,91	-
Álcoois superiores (mg/100mL álcool anidro)	332,90	496,37	0-360
Furfural (mg/100mL álcool anidro)	0,00	0,00	0-5
Coeficiente de congêneres (mg/100mL álcool anidro)	376,78	524,99	200-650
Cobre (mg/L)	0,02	0,00	0-5

Álcoois superiores são expressos pela soma dos álcoois propílico, iso-butílico e iso-amílico

Os valores de referência são estabelecidos pela legislação brasileira para a identidade e qualidade da aguardente de vegetal (BRASIL, 2008)

A cabeça é a fração do destilado formada principalmente por compostos voláteis de ponto de ebulição inferior ao álcool etílico. São componentes característicos da cabeça os aldeídos (aldeído acético), os ésteres (acetato de etila) e o metanol (ALCARDE et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

O aldeído acético ou acetaldeído é o principal aldeído presente nos destilados, representando cerca de 90% do total de aldeídos em bebidas não

envelhecidas. O aldeído acético é um composto que diminui a qualidade do destilado e em altas concentrações possui sabor pungente e reatividade química. A presença de altas concentrações de acetaldeído no destilado é um indicativo de oxidação do etanol durante a fermentação alcoólica (ALCARDE et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

O valor máximo de aldeído acético permitido pela legislação brasileira é de 30 mg/100 mL (BRASIL, 2008). Neste estudo, o teor de aldeídos encontrado na fração coração das aguardentes foi de 16,08 mg/100 mL (batata doce) e 13,81 mg/100 mL (milho verde). Os valores desse trabalho podem ser comparados com a aguardente de jabuticaba, onde foi encontrado 13,60 mg/100 mL de aldeído acético (ASQUIERI et al., 2009).

O acetato de etila é outro composto que pode afetar a qualidade do destilado devido ao sabor desagradável em altas concentrações. O acetato de etila é o éster encontrado em maior quantidade nas aguardentes, representando aproximadamente 80% do total dos ésteres. Baixas concentrações de acetato de etila contribuem para a complexidade aromática do destilado, no entanto, concentrações elevadas desses ésteres diminuem a qualidade do destilado, conferindo-lhe um sabor enjoativo e desagradável (HERNÁNDEZ-GÓMEZ et al., 2003; LIMA et al., 2006).

O valor máximo de acetato de etila permitido pela legislação brasileira é de 200 mg/100 mL (BRASIL, 2008). Neste estudo, o teor de acetato de etila encontrado na fração coração das aguardentes foi de 22,61 mg/100 mL (batata doce) e 14,71 mg/100 mL (milho verde). HERNÁNDEZ-GÓMEZ et al. (2003) encontraram valores de acetato de etila de 4,08 a 15,4 mg/100 mL em aguardentes de melão.

A presença de metanol em bebidas destiladas não é desejada, pelo fato deste ser tóxico ao homem. O valor máximo de metanol permitido pela legislação brasileira é de 20 mg/100 mL (BRASIL, 2008). Neste estudo, somente a aguardente de milho verde apresentou teor de metanol (19,91 mg/100 mL) dentro do limite permitido pela legislação brasileira. A aguardente de batata doce apresentou alto conteúdo de metanol (182,86 mg/100 mL), em níveis muito superiores ao permitido pela legislação brasileira.

Um alto teor de metanol nas bebidas destiladas origina-se da degradação da pectina, um polissacarídeo normalmente presente nas frutas (ALVARENGA, 2011). Na cachaça, a presença do metanol é está relacionado a um inadequado processo de filtração do mosto, o que possibilita a presença de bagacilhos (fragmentos da cana-de-açúcar contendo pectina) no processo fermentativo (SCHMIDT et al., 2009).

Neste trabalho houve diferença na metodologia de preparo dos mostos. Os grãos de milho verde obtidos das espigas foram adicionados de água e triturados com uso de liquidificador. Essa solução foi filtrada em peneira para remoção do bagaço e então foi hidrolisada e fermentada. Já no preparo da batata doce não houve processo de filtragem da solução antes do processo de hidrólise e fermentação alcoólica. No trabalho de Souza, (2014) tanto a fração cabeça (99,88 mg/100 ml) quanto a fração coração (127,15 mg/100 ml) da aguardente de mandioca apresentaram altos conteúdos de metanol. Comparando este trabalho com o trabalho de Souza, (2014) observa-se que pelo processo de filtragem do mosto de milho verde antes do processo de hidrólise, reduziu o teor de metanol na aguardente de milho verde.

No trabalho de CLETO (2000) constatou-se total ausência de metanol nas aguardentes produzidas de cana-de-açúcar, laranja e uva, o que se atribuiu ao processo tecnológico empregado: filtração, clarificação e centrifugação, que não permitiram a passagem de materiais que contivessem pectina para a etapa de fermentação alcoólica.

Em outros países os limites de metanol nas bebidas destiladas diferem bastante da legislação brasileira. Nos EUA, o limite de metanol em aguardentes de frutas destiladas é de 700 mg/100mL de álcool anidro. Na UE (União Europeia Regras N^o.1567 / 89, 1989) o limite de metanol para as aguardentes feitas de frutas é de 1000 mg/100mL de álcool anidro e para as aguardentes feitas de ameixas, maçãs e pêras esse limite sobe para 1200 mg/100mL de álcool anidro.

Os álcoois superiores constituem, quantitativamente, o maior grupo de substâncias voláteis nas bebidas destiladas. Os valores dos álcoois superiores são obtidos pela soma dos álcoois propílico, iso-butílico e iso-amílico. A formação de álcoois superiores tem uma forte influência no sabor das bebidas

destiladas devido ao aroma característico. Os álcoois superiores, com três a cinco carbonos, apresentam odores característicos, tradicionalmente associados a bebidas destiladas. Acima de cinco carbonos, estes álcoois tornam-se oleosos, sendo que alguns deles lembram o aroma de flores (ALVARENGA, 2011; VILELA, 2005). No entanto, o excesso de álcoois superiores interfere negativamente na qualidade das bebidas destiladas.

Os álcoois superiores são produtos da quebra de aminoácidos no processo de fermentação, onde o álcool iso-amílico é produto da quebra do aminoácido leucina e o álcool iso-butílico é produto da quebra do aminoácido valina. Segundo Maia e Campelo (2005), a levedura tem função primordial no processo de fermentação, influenciando no teor de álcoois superiores que serão formados, implicando na qualidade da aguardente. Elevadas temperaturas (acima de 32 °C), pH de 3,0 a 3,5 e aeração são fatores que favorecem a produção de álcoois superiores principalmente do iso-amílico (SOUZA et al., 2009).

Neste trabalho, os teores de álcoois superiores encontrados nas aguardentes de milho verde (496,37 mg/100mL) e batata doce (332,90 mg/100mL) foram elevados, ficando a aguardente de milho verde acima do permitido pela legislação brasileira que é de 360 mg/100 mL (BRASIL, 2008). No trabalho de Barcelos et al. (2007) os teores de álcoois superiores encontrados nas cachaças de Minas Gerais foram menores: as amostras do Sul de Minas tiveram média de 176,6 mg 100 mL⁻¹ álcool etílico anidro, as produzidas no Vale do Jequitinhonha tiveram média de 235,1 mg 100 mL⁻¹ álcool etílico anidro e as cachaças coletadas na Zona da Mata apresentaram média de 221,9 mg 100 mL⁻¹ álcool etílico anidro. A formação de álcoois superiores é maior quando ocorre demora no processo fermentativo (SOUZA et al., 2009). Assim, os resultados deste trabalho mostram que o tempo de fermentação de 5 dias deve ser reduzido para 1-2 dias, de forma a minimizar a produção de álcoois superiores nas aguardentes de milho verde e batata doce.

6. Conclusão

A produção das aguardentes a partir das matérias primas amiláceas batata doce e milho verde mostrou-se viável em escala laboratorial. O rendimento da aguardente de batata doce (13,3 litros da aguardente a 40°GL para cada 100 Kg de batata doce) foi comparável ao rendimento da cachaça (10 litros de cachaça para cada 100 kg de cana-de-açúcar). Já o rendimento da aguardente de milho verde (8,4 litros da aguardente a 51°GL para cada 100 Kg de milho verde) foi comparável ao rendimento da graspa (10 litros de graspa a 50°GL para cada 100 kg de bagaço de uva). Esses resultados mostraram que o processo de hidrólise dos amidos em açúcares fermentescíveis foi eficiente para obter um bom rendimento em álcool, o que possibilita tornar as aguardentes de batata doce e milho verde competitivas com as outras aguardentes comerciais já produzidas em escala industrial.

A determinação dos componentes secundários mostrou que a aguardente de batata doce apresentou elevado teor de metanol e de álcool n-butílico, não se enquadrando nos parâmetros exigidos pela legislação brasileira. A aguardente de milho verde teve resultados melhores, mas também ficou fora dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira por apresentar teor de álcoois superiores acima do permitido. Sendo assim, para estudos futuros existe necessidade de adequação das metodologias. Para a aguardente de batata doce, o processo de filtragem do mosto antes da etapa de hidrólise, deve reduzir o teor de metanol do destilado. E, para ambas as aguardentes, o tempo de fermentação alcoólica de 5 dias deve ser reduzido para 1-2 dias, com o objetivo de minimizar a produção de álcoois superiores.

7. Referencias bibliográficas

ABUJAMRA, L. B. **Produção de destilado alcoólico a partir de mosto fermentado de batata-doce**. Tese (Doutorado), UNESP, Botucatu, SP, 135 p., 2009.

ALCARDE, R. A.; SOUZA, P. A.; BOSQUEIRO, A. C.; BELLUCO, A. E. S. Cinética de volatilização de componentes secundários da aguardente de cana-de-açúcar durante dupla destilação em alambique simples. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 4, p. 271-278, 2010.

ALCARDE, A. R.; SOUZA, P. A.; BOSQUEIRO, A. C.; BELLUCO, A. E. S. Perfil físico-químico de aguardente de cana-de-açúcar produzida por metodologias de dupla destilação em alambique simples, **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.3, p. 499-503, 2009.

ALMEIDA, E. G. **Caracterização físico-química e microbiológica de bebidas fermentadas produzidas pelos índios Tapirapé**, Tese (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 114 p., 2009.

ALVARENGA, R. M. **Avaliação de parâmetros da fermentação e da destilação para adequação dos teores de compostos secundários em aguardente de banana**, Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, 155 p., 2011.

ALVES, H. O. **Obtenção e análise físico-química do destilado alcoólico da cajarana (*Spondias sp*) no semiárido paraibano**, Tese de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, 74 p., 2011.

AOAC - Official methods of analysis, Washington, 18 ed., 2006.

ARAÚJO, V. Q. **Propriedades funcionais e térmicas do amido de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) nativo e modificado quimicamente**. Tese

(Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), 90 p., Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

ASQUIERI, E. R., SILVA, A. G. M.; CÂNDIDO, M. A. Aguardente de jabuticaba obtida da casca e borra da fabricação de fermentado de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 896-904, 2009.

AZEVEDO, S. M. et al. Levantamento da contaminação por cobre nas aguardentes de cana-de-açúcar produzidas em Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n.3, p. 618-624, 2003.

BARCELOS, L. V. F. et al. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: zona da mata, sul de minas e vale do Jequitinhonha, **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1009-1011, 2007.

BENTLEY, R. From *miso*, *saké* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for kojic acid, **Natural Product Reports**, v. 23, p. 1046-1062, 2006.

BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. **Food Chemistry**, Reading, v.139, p.695-701, 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, Brasília, DF, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PORTARIA Nº 65, DE 23 DE ABRIL DE 2008. Regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas destiladas: aguardente de melaço, aguardente de cereal, aguardente de vegetal, aguardente de rapadura, aguardente de melado, aguardente de fruta, arac, rum, sochu, tequila, tiquira e uísque. Brasília, DF, 2008.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 229, de 25 de outubro de 1988. Complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho, Brasília, DF, 1988.

BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; CARABIN, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.33, n. 1, p. 80–101, 2001.

CAMPOS L. M. A. S. **Estudo dos parâmetros fermentativos na obtenção de aguardente de mel**, Tese (Doutorado), Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2011.

CANCELIER, A. et al. Influência de parâmetros de processo na obtenção de bebida fermento-destillada de uva-japão (*Hovenia dulcis Thunberg*). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.16, n.1, p. 59-67, 2013.

CANIATO et al. Composição de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido nos grãos verdes de cultivares de milho na colheita, **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.1, p.38-44, 2004.

CARVALHO, W. et al. Cinética da fermentação e balanço de massa da produção de cachaça artesanal, **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 1-7, 2008.

CEREDA, M. P. Tiquira e outras bebidas de mandioca. In: VENTURINI FILHO, W. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, cap. 21, p.525-550, 2005.

CLETO, V. G. **Ação da lecitina no processo fermentativo, rendimento e composicao das aguardentes em mosto de cana de açúcar, laranja e uva.** Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 73p., 2000.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – **Acompanhamento de Safra Brasileira: grãos.** Safra 2013/2014, Brasília: Conab, 2013. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_12_10_16_06_56_bol_etim_portugues_dezembro_2013.pdf, Acesso em: 10 de Março de 2015.

EMBRAPA HORTALIÇAS, **Batata-doce (*Ipomoea batatas*)**, Sistemas de Produção, 2008. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Batata-doce/Batata-doce_Ipomoea_batatas/autores.htm. Acesso em: 02/11/15.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation, **Journal of Basic Microbiology**, v. 42,n. 5, p. 320–326, 2002.

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Methanol content of grappa made from New York grape pomace, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3923–3925, 2008.

HERNÁNDEZ-GÓMEZ, L. F.; ÚBEDA, J.; BRIONES, A. Melon fruit distillates: comparison of different distillation methods. **Food Chemistry**, v. 82, p. 539-543, 2003.

HUAQUIRA, S. M. **Proceso de elaboración de chicha de maíz (*Zea mays*): caso municipios de Punata, Cliza, Arbieto, Sipe Sipe, Tapacarí e independencia del departamento de Cochabamba.** Trabalho de Conclusão de Curso, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolívia, 143 p., 2007.

HU, H. L.; GRUBEN, B. S.; WÖSTEN, H. A. B.; GU, J. D.; VRIES, R. P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 248-252, 2011.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ, Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: O Instituto, 1985.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria de aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242 p.

KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Características do milho doce (*Zea mays* L.) para industrialização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, n. 2, p. 93 – 103, 2006.

LIMA, A. J. B. et al. Emprego do carvão ativado para remoção de cobre em cachaça. **Química Nova**, v. 29, p. 247-250, 2006.

LIMA, U. A. et al. Processos fermentativos. In: LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, p. 90-122.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future. **Oxford Journals**, v. 15, n. 4, p. 173-183, 2008.

MAIA, A. B. R. A.; CAMPELO, E. A. P. **Tecnologia da cachaça de alambique**. Belo Horizonte: SEBRAE/MG; SINDEBEBIDAS, 129 p. 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 4, p. 426, 1959.

MIRANDA M. B.; MARTINS N. G. S.; BELLUCO A. E. S.; HORII J.; ALCARDE A. R. Qualidade química de cachaças e de aguardentes brasileiras, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 897-901, 2007.

MONCLARO, A. V. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por *Aspergillus oryzae* quando crescido em resíduos têxteis**. 110 p. Mestrado em Biologia Molecular, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília, 2014.

MOREIRA R. F. A.; NETTO C. C.; E MARIA C. A. B. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil, **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1819-1826, 2012.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v.24, p. 80-85, 2006.

NUNES, M. U. C.; CRUZ, D. P.; FORTUNA, A. **Tecnologia para produção de farinha de batata-doce: novo produto para os agricultores familiares**, Circular Técnica 65, EMBRAPA. Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/ct_65.pdf. Acesso em: 02/11/15.

ODA, K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; IEFUJI, H.; AKITA, O.; IWASHITA, K., Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under Submerged and Solid-State Culture Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3448-3457, 2006.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1 ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. E. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 32, p. 59-68, 2009.

PINHO, L.; PAES, M. C. D.; GLORIA, M. B. A.; ALMEIDA, A. C.; COSTA, C. A. Composição química e cor de milho verde cultivado em sistemas de produção orgânico e convencional, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n.2, p. 366-371, 2011.

PINTO, A. C. R. T. **Caracterização do secretoma de *Aspergillus oryzae* crescido em estado sólido de bagaço de cana**, 57 p., Mestrado em Biologia Molecular, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília, 2012.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Sistema de Produção de Graspá**. EMBRAPA, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Graspá/SistemaProducaoGraspá/destilacao.htm>, Acessado em: 11/11/15.

SANTOS, C. C. A. A. **Identificação da microbiota e caracterização físico-química da bebida fermentada caxiri produzida pelo povo Juruna (Yudjá), Mato Grosso, Brasil**, Tese (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 95 p., 2010.

SCHMIDT, L.; MARMITT, S.; OLIVEIRA, E. C.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas de aguardentes produzidas artesanalmente na região do vale do Taquari no Rio Grande do Sul, **Alimentos e Nutrição**, v.20, n.4, p. 539-551, 2009.

SHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J.C., VAN DIJCK, P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 426–435, 2002.

SINGH, J.; KAUR, P. Optimization of process parameters for cellulose production from *Bacillus* sp. JA14 in solid substrate fermentation using response surface methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n.4, pg. 505 – 512, 2012.

SLIVINSK, C. T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. Tese (Mestrado), Universidade estadual de Ponta Grossa, Paraná, 93 p., 2007.

SOARES, I. A.; FLORES, A.C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S. C.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SORATTO A. N.; VARVAKISII G.; HORII, J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p.681-687, 2007.

SOUZA, I. A. **Produção de aguardente de mandioca utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* para liquefação e sacarificação do amido**. 2014. 45 f., Monografia (Bacharelado em Farmácia), Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SOUZA, L. M.; ALCARDE, A. R.; LIMA, F. V.; BORTOLETTO, A. M. **Produção de cachaça de qualidade**, Piracicaba: ESALQ, 2013, 72 p.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850 – 861, 2010.

SOUZA, L. M. et al. Teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na região norte fluminense - Rio de Janeiro. **Química Nova**, v.32, n.9, p. 2304-2309, 2009.

TACO, Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 4ª edição revisada e ampliada, Campinas, SP, 2011, 161 p.

VENTURINI FILHO, W. G.; NOGUEIRA, A. M. P. **Aguardentes e cachaça**, Botucatu: UNESP, 65 p. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Horticultura/aguardentes-e-cachaca-2013.pdf>, Acesso em: 11/11/15.

VILELA, A. F. **Estudo da adequação de critérios de boas práticas de fabricação na avaliação de fábricas de cachaça de alambique**, Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte, MG, 95 p., 2005.

Anexo 1 - Laudo das aguardentes de batata doce e milho verde



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"



DEPARTAMENTO DE AGROINDÚSTRIA, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
Av. Pádua Dias, 11 • Cap. 13418-900 • Piracicaba, SP • Brasil
Fone (19) 3429 4110 • Fax (19) 3422 1733
www.esalq.usp.br

CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 01-11/15

Amostras de aguardente. Interessada: Daniela Orsi.

Itens analisados / Amostras	Mandioca	Batata	Milho	Referência (IN 13)
Grau alcoólico real a 20°C (v/v)	48,10	62,89	51,18	38-54
Ácidos voláteis em ácido acético (mg/100mL álcool anidro)	7,77	5,26	0,10	0-150
Aldeídos em aldeído acético (mg/100mL álcool anidro)	0,89	16,01	13,81	0-30
Ésteres em acetato de etila (mg/100mL álcool anidro)	3,66	22,61	14,71	0-200
Alcool metílico (mg/100mL álcool anidro)	71,21	182,86	19,91	0-20
Alcool sec-butanol (mg/100mL álcool anidro)	nd	nd	nd	0-10
Alcool propílico (mg/100mL álcool anidro)	52,70	33,52	54,92	-
Alcool iso-butílico (mg/100mL álcool anidro)	129,06	123,77	181,54	-
Alcool n-butílico (mg/100mL álcool anidro)	0,64	7,71	0,31	0-3
Alcool iso-amílico (mg/100mL álcool anidro)	154,37	175,61	259,91	-
Alcoois superiores (mg/100mL álcool anidro)	336,13	332,90	496,37	0-360
Furfural (mg/100mL álcool anidro)	nd	nd	nd	0-5
Coefficiente de congêneres (mg/100mL álcool anidro)	348,46	376,78	524,99	200-650
Cobre (mg/L)	0,01	0,02	nd	0-5

nd = não detectado

OBSERVAÇÕES: (1) A presente análise tem valor restrito à amostra recebida no laboratório. A identificação da amostra é de exclusiva responsabilidade do remetente. (2) Certificado com resultados exclusivamente destinados para a finalidade de pesquisa científica acadêmica. (3) O serviço de análises compreende exclusivamente a entrega do certificado ao interessado, não cabendo ao Laboratório e seus pesquisadores fornecerem qualquer parecer e/ou assessoria sobre certificado emitido.

METODOLOGIAS UTILIZADAS:

ALCARDE, A.R.; SOUZA, L.M.; BORTOLETTO, A.M. Ethyl carbamate kinetics in double distillation of sugar cane spirit. *Journal of the Institute of Brewing*, v.118, n.1, p.27-31, 2012.
BORTOLETTO, A.M.; ALCARDE, A.R. Congeners in sugar cane spirits aged in casks of different woods. *Food Chemistry, Reading*, v.139, p.695-701, 2013.

Piracicaba, 7 de novembro de 2015.

Prof. Dr. André Ricardo Alcarde (CREA: 5060223704)
Laboratório de Tecnologia e Qualidade de Bebidas

